

DOCKET NO.: 265980US0PCT

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

IN RE APPLICATION OF: Hiroyuki YANO, et al.
SERIAL NO.: NEW U.S. PCT APPLICATION
FILED: HERewith
INTERNATIONAL APPLICATION NO.: PCT/JP03/08668
INTERNATIONAL FILING DATE: July 8, 2003
FOR: METHOD FOR DETECTING ALLERGEN PROTEIN

REQUEST FOR PRIORITY UNDER 35 U.S.C. 119
AND THE INTERNATIONAL CONVENTION

Commissioner for Patents
Alexandria, Virginia 22313

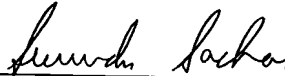
Sir:

In the matter of the above-identified application for patent, notice is hereby given that the applicant claims as priority:

<u>COUNTRY</u>	<u>APPLICATION NO</u>	<u>DAY/MONTH/YEAR</u>
Japan	2002-236048	13 August 2002

Certified copies of the corresponding Convention application(s) were submitted to the International Bureau in PCT Application No. PCT/JP03/08668. Receipt of the certified copy(s) by the International Bureau in a timely manner under PCT Rule 17.1(a) has been acknowledged as evidenced by the attached PCT/IB/304.

Respectfully submitted,
OBLON, SPIVAK, McCLELLAND,
MAIER & NEUSTADT, P.C.



Norman F. Oblon
Attorney of Record
Registration No. 24,618
Surinder Sachar
Registration No. 34,423

Customer Number

22850

(703) 413-3000
Fax No. (703) 413-2220
(OSMMN 08/03)

11 FEB 2003

PCT/JP03/08668

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

08.07.03

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application: 2002年 8月13日

出願番号
Application Number: 特願2002-236048

[ST. 10/C]: [JP2002-236048]

出願人
Applicant(s): 独立行政法人農業技術研究機構

REC'D 22 AUG 2003

WIPO

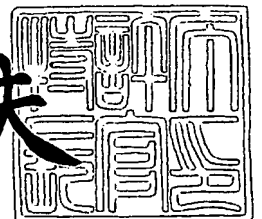
PCT

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 8月 8日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今井康夫



BEST AVAILABLE COPY

【書類名】 特許願

【整理番号】 P02-0355

【提出日】 平成14年 8月13日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 G01N 30/00
G01N 33/00

【発明の名称】 アレルゲン蛋白質の検出方法

【請求項の数】 12

【発明者】

 【住所又は居所】 新潟県上越市南新町 1 - 1 0 - 1 0 1

 【氏名】 矢野 裕之

【発明者】

 【住所又は居所】 新潟県上越市南新町 5 - 2 0 - 1 0 7

 【氏名】 黒田 秧

【特許出願人】

 【識別番号】 501203344

 【氏名又は名称】 独立行政法人 農業技術研究機構

【代理人】

 【識別番号】 100091096

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 平木 祐輔

【選任した代理人】

 【識別番号】 100118773

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 藤田 節

【選任した代理人】

 【識別番号】 100119183

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 松任谷 優子

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 0110464

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 アレルゲン蛋白質の検出方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 被験試料中の蛋白質の遊離 S H 基を化学修飾することにより保護し、遊離 S H 基が保護された蛋白質のジスルフィド結合を切断して S H 基を露出させ、露出した S H 基を検出することを含む、ジスルフィド結合を有する蛋白質の検出方法。

【請求項 2】 露出した S H 基と、S H 基を標識する物質とを反応させて、標識された S H 基が発するシグナルを検出することにより、露出した S H 基を検出する、請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】 前記シグナルの検出の前に、二次元電気泳動により被験試料中の蛋白質を分離することを特徴とする、請求項 2 記載の方法。

【請求項 4】 化学修飾がヨードアセトアミドによるアルキル化であること、及び S H 基を標識する物質がモノプロモビマンであることを特徴とする、請求項 2 又は 3 記載の方法。

【請求項 5】 被験試料中の蛋白質の遊離 S H 基を化学修飾することにより保護し、遊離 S H 基が保護された蛋白質のジスルフィド結合を切断して S H 基を露出させ、露出した S H 基を検出することを含む、アレルゲン蛋白質の検出方法。

【請求項 6】 露出した S H 基と、S H 基を標識する物質とを反応させて、標識された S H 基が発するシグナルを検出することにより、露出した S H 基を検出する、請求項 5 記載の方法。

【請求項 7】 前記シグナルの検出の前に、二次元電気泳動により被験試料中の蛋白質を分離することを特徴とする、請求項 6 記載の方法。

【請求項 8】 化学修飾がヨードアセトアミドによるアルキル化であること、及び S H 基を標識する物質がモノプロモビマンであることを特徴とする、請求項 6 又は 7 記載の方法。

【請求項 9】 被験試料がイネ科植物の種子、花粉又はハウスダストからの蛋白質抽出物である、請求項 5 ～ 8 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 10】 S H基保護剤及びS H基検出物質を含む、ジスルフィド結合を有する蛋白質又はアレルゲン蛋白質を検出するためのキット。

【請求項 11】 ヨードアセトアミド及びモノブロモビマンを含む、ジスルフィド結合を有する蛋白質又はアレルゲン蛋白質を検出するためのキット。

【請求項 12】 還元剤をさらに含む、請求項 10 又は 11 記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、蛋白質の検出法、特にアレルゲン蛋白質の検出方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

アレルゲン蛋白質は我々の生活環境に広く存在している。アレルゲン蛋白質は食品アレルギー、ハウスダストアレルギー、花粉症等をもたらす有害な作用を示し、時にはアナフィラキシー等の致命的な症状を引き起こすこともある。アレルギー発症のメカニズムを解明し、防御法を開発するためには、アレルゲン蛋白質を包括的にスクリーニングすることが重要な課題である。

【0003】

従来のアレルゲン蛋白質のスクリーニング法としては、イムノブロッティング法による検出法、すなわち蛋白質をニトロセルロースやP V D F等の膜に転写し、その蛋白質とアレルギー患者の血清中のIgE抗体とを反応させて、蛋白質に結合した抗体を検出する方法が用いられている（例えば、Weiss, W., et al., Electrophoresis, 18, 826-833 (1997)）。この方法を用いる場合、膜に転写する際に微量なアレルゲン蛋白質が失われやすく、重要なアレルゲン蛋白質が検出されずに見逃される可能性があった。そのため、ブロッティング手順を必要とせずにアレルゲン蛋白質を検出できる方法が求められている。

【0004】

一方、一般的な蛋白質の検出方法としては、蛋白質を含む試料を二次元電気泳動 (O'Farrell, P. H., et al, Journal of Biological Chemistry, 250, pp 40 07-4021 (1975)) した後、銀染色、色素染色（クーマシー染色）、ネガティブ

染色又は蛍光染色等によりゲルを染色して蛋白質を可視化する方法が慣用されている。

【0005】

さらに、試料中の蛋白質を予め還元してからモノブロモビマンにより蛍光標識し、それを二次元電気泳動に供し、蛍光シグナルを可視化することにより、蛋白質を高感度に検出する方法も知られている (Urwin, V. E., and Jackson, P., Anal. Biochem. 209, 57-62 (1993))。

しかしながら、アレルゲン蛋白質を高感度に検出できる方法は知られていない。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、アレルゲン蛋白質を高感度に検出する方法を提供することを目的とする。

【0007】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記課題を解決するため鋭意研究を重ねた結果、被験試料中の蛋白質の遊離SH基を保護し、次いで該蛋白質のジスルフィド結合を切断して該結合を形成していたSH基を露出させ、露出したSH基を特異的に検出することにより、ジスルフィド結合を有する蛋白質を検出する方法を開発した。本発明者はさらに、この方法を用いて、被験試料に含まれるアレルゲン蛋白質を検出することに成功した。

【0008】

この成果に基づき完成された本発明は、以下の通りである。

[1] 被験試料中の蛋白質の遊離SH基を化学修飾することにより保護し、遊離SH基が保護された蛋白質のジスルフィド結合を切断してSH基を露出させ、露出したSH基を検出することを含む、ジスルフィド結合を有する蛋白質の検出方法。

【0009】

この方法において、露出したSH基の検出は、露出したSH基と、SH基を標

識する物質とを反応させて、標識されたSH基が発するシグナルを検出することによって行うことが好ましい。またこの場合、そのシグナルの検出の前に、二次元電気泳動により被験試料中の蛋白質を分離することが好ましい。

【0010】

この方法においては、特に、化学修飾がヨードアセトアミドによるアルキル化であること、及びSH基を標識する物質としてモノブロモビマンを用いることが好適である。

【0011】

[2] 上記[1]に記載したジスルフィド結合を有する蛋白質の検出方法を利用する、アレルゲン蛋白質の検出方法。

この方法で被験試料として用いる好適な例としては、イネ科植物の種子、花粉又はハウスダストからの蛋白質抽出物が挙げられる。

【0012】

[3] SH基保護剤及びSH基検出物質を含む、ジスルフィド結合を有する蛋白質又はアレルゲン蛋白質を検出するためのキット。

【0013】

[4] ヨードアセトアミド及びモノブロモビマンを含む、ジスルフィド結合を有する蛋白質又はアレルゲン蛋白質を検出するためのキット。

これらの[3]及び[4]のキットは、さらに還元剤を含んでいてもよい。

【0014】

【発明の実施の形態】

本発明は、第1に、ジスルフィド結合を有する蛋白質を特異的に検出する方法に関する。この方法は以下の手順で行うものである。すなわち、

- ①蛋白質の有する遊離SH基を化学修飾することにより保護し、
- ②遊離SH基が保護された蛋白質のもつジスルフィド結合を切断して、該ジスルフィド結合を形成していたSH基を露出させ、
- ③露出したSH基を検出することによって、露出したSH基を有する蛋白質を、ジスルフィド結合を有する蛋白質として同定する。

【0015】

本発明のこの方法は、限定するものではないが、好適には次のような工程を用いて実施される。図1にその工程を模式的に示す。

- ①被験試料中の蛋白質を、化学修飾により遊離SH基を保護する物質（以下、「SH基保護剤」と称する）と反応させる。これにより、蛋白質の遊離SH基は化学修飾されて（図1中、SH基保護剤により化学修飾された遊離SH基を○で示す）、SH基に対する反応が起こらなくなる（図1①）。
- ②遊離SH基が保護された蛋白質を、還元剤と反応させる。これにより、該蛋白質のもつジスルフィド結合（図1中、「S-S」として示す）が開裂し、ジスルフィド結合を形成していたSH基が露出する（図1②）。
- ③SH基を選択的に修飾する物質であって、かつその修飾が検出可能なものである物質（以下、「SH基検出物質」と称する）と、露出したSH基とを反応させる。これにより、露出したSH基は修飾されて（図1中、SH基検出物質により修飾されたSH基を●で示す）、かつその修飾が検出できるようになる（図1③）。次いで、露出したSH基の修飾を検出することにより、露出したSH基を検出する。検出された該SH基を有する蛋白質を、ジスルフィド結合を有する蛋白質として同定する。

【0016】

本発明では、このような検出方法を用いることによって、ジスルフィド結合を有する蛋白質を、特異的にかつ高感度で検出することができる。

【0017】

また本発明は、第2に、上記のジスルフィド結合を有する蛋白質の検出方法を利用したアレルギー蛋白質の検出方法に関する。本発明のアレルギー蛋白質の検出方法を用いると、被験試料中のアレルギー蛋白質を効率良く検出することができる。特に、本発明のアレルギー蛋白質の検出方法では、従来のアレルギー蛋白質のスクリーニング法では検出されにくかった微量なアレルギー蛋白質も、高感度に検出することができる。

【0018】

以下、本発明を詳細に説明する。

1. 本明細書で使用する基本的な用語の定義

本明細書では、以下の用語を定義した意味に従って使用する。

(1) 「蛋白質」とは、原則として、アミノ酸が互いに脱水縮合して生成されるポリペプチド鎖又はペプチド鎖を意味する。但し本発明の「蛋白質」には、加水分解によりアミノ酸だけを生成する単純蛋白質だけでなく、加水分解によりアミノ酸とアミノ酸以外の有機物とを生成する複合蛋白質（例えば、核蛋白質、糖蛋白質、リポ蛋白質、燐蛋白質、色素蛋白質等）、誘導蛋白質（例えば、ゼラチン、ペプトン、プロテオース等）等も包含する。これらの蛋白質は、さらに酵素的又は化学的に修飾されていてもよい。

【0019】

(2) 「ジスルフィド結合を有する蛋白質」とは、非還元条件下で、蛋白質分子内又は蛋白質分子間においてジスルフィド結合を形成している蛋白質を意味する。このジスルフィド結合は、当該蛋白質において、生体内で形成されるジスルフィド結合であってもよいが、生体内では形成されないジスルフィド結合でもよい。

【0020】

(3) 「アレルゲン」とは、ヒト又は哺乳動物において、アレルギー反応を誘導する原因となる抗原物質を意味する。一方、「アレルゲン蛋白質」とは、ヒト又は哺乳動物において、アレルギー反応を誘導する抗原となる蛋白質を意味する。該蛋白質は、遺伝子からの転写翻訳により産生される全長蛋白質でもよいし、その断片であってもよい。アレルゲン蛋白質はアレルゲンの一成分である場合もある。また「アレルゲン性」とは、ある物質が、ヒト又は哺乳動物においてアレルギー反応を惹起する能力を意味する。

【0021】

(4) 「SH基」とは、蛋白質のスルフヒドリル基を意味する。一般に、この基はチオール基、メルカプト基とも呼ばれる。

【0022】

2. ジスルフィド結合を有する蛋白質の検出法

(1) 被験試料

本明細書においては、本発明の方法を適用する対象である試料を「被験試料」と称する。被験試料としては、ジスルフィド結合を有する蛋白質又はアレルゲン

蛋白質を含有することが予想される試料である限り、任意の試料を用いることができる。この被験試料は、1種類の蛋白質を含有するものでもよいし、複数種類の蛋白質を含有するものであってもよい。含有される蛋白質は、単離されていない蛋白質であってよいが、予め単離された蛋白質を含んでいてもよく、予め単離された蛋白質のみで構成されていてもよい。

【0023】

被験試料として想定される試料としては、例えば、食品、医薬、医療材料、化粧品、繊維製品、環境検査用試料（例えば空気、水、土壌等の試料）、植物性試料、動物性試料、アレルゲン候補物質、既知アレルゲン、既知アレルゲン蛋白質及び研究用試料（例えば、ジスルフィド結合の形成が予想される蛋白質等）が挙げられる。限定するものではないが、具体的には例えば、魚、肉、乳製品（牛乳、ヨーグルト、チーズ等）、卵使用製品（マヨネーズ、菓子類、麺類等）、惣菜、調味料、香辛料、栄養補助食品、ウール製品、羽毛製品、ハウスダスト、花粉（例えばスギ花粉、ブタクサ花粉）、食物アレルゲン（コメ、コムギ等のイネ科植物の種子、ソバ、ダイズ、卵白及び牛乳等）、動物由来アレルゲン（イヌ、ネコ、マウス、ラット、ウマ、ウシ等）、植物由来アレルゲン（ピーナッツ、ウルシ等）、昆虫アレルゲン、寄生虫アレルゲン及びカビアレルゲン等から調製した蛋白質抽出物が挙げられる。さらに、被験試料の例としては、卵白アルブミン、オボムコイド、 β ラクトグロブリン、 α カゼイン、ダニ抗原（例えばコナヒョウヒダニ抗原）、ウシ血清アルブミン、トリプシン／アミラーゼインヒビター、グルテリン、 α -グロブリン、グリシニン、単離された天然蛋白質、組換え蛋白質、天然のアミノ酸配列を改変した蛋白質、合成蛋白質及びアレルゲン候補蛋白質等の精製蛋白質が挙げられる。これらの被験試料は単独で用いてもよいが、組み合わせて1つの被験試料として用いてもよい。

【0024】

(2) 被験試料中の蛋白質の遊離SH基の保護

本方法ではまず、上記2-(1)に記載した被験試料に含まれる蛋白質の遊離SH基を化学修飾することによって保護して、SH基に対する反応が起こらないようにする。その結果、後にジスルフィド結合を切断して露出させたSH基を検出す

る際に、遊離SH基は一緒に検出されなくなり、ジスルフィド結合を形成していたSH基だけが検出される。本明細書において「遊離SH基」とは、ジスルフィド結合を形成可能な条件（例えば中性又は酸性条件）下においてジスルフィド結合を形成していない、蛋白質中のSH基を意味する。

【0025】

本明細書では、化学修飾することにより蛋白質の遊離SH基を保護して、該遊離SH基においてSH基に対する反応が起こらないようにする物質を、「SH基保護剤」と称する。SH基保護剤による「遊離SH基の化学修飾」とは、具体的には、SH基に対するメルカプチドの形成、アルキル化、ジスルフィド交換を伴う酸化等が挙げられる。

【0026】

本発明では、SH基保護剤として、上記のようにSH基を化学修飾して保護する任意の物質を用いることができる。SH基保護剤の具体的な例としては、蛋白質中のSH基の保護修飾剤として用いられるSH試薬、蛋白質のSH基に反応してその活性を阻害するSH阻害剤等が挙げられる。

【0027】

さらに具体的なSH基保護剤の例としては、限定するものではないが、(1) 重金属（例えば水銀、銀、カドミウム、鉛、銅等）及びそれらの化合物（例えばp-メルクリ安息香酸（PMB）、p-クロロメルクリ安息香酸（PCMB）、p-メルクリベンゼンスルホン酸（PMB S）、酢酸フェニル水銀（PMA）イ、エチル水銀、4-クロロメルクリ-4'-ジメチルアミノベンゼン、4-クロロメルクリフェニルアゾ-β-ナフトール、サリルガン、S-メルクリダンシルステイン等）等のメルカプチド形成剤、(2) ハロゲン化アルキル（例えばヨード酢酸、ヨードアセトアミド）、マレイミド誘導体（例えばN-エチルマレイミド（NEM））等のアルキル化剤、(3) 5,5'-ジチオビス(2-ニトロ安息香酸)（DTNB, エルマン試薬）、4,4'-ジチオピリジン、2,2'-(4,4')-ジピリジルジスルフィド、テトラチオン酸（塩）、テトラニトロメタン、2,6-ジクロロフェノールインドフェノール（DCIP）、酸化型グルタチオン等の酸化剤、(4) 三酸化二ヒ素、亜ヒ素塩等が挙げられる。本発明におけるSH基保護剤として

は、アルキル化剤を用いることが好ましく、ヨードアセトアミド (IAA) を用いることが特に好ましい。

【0028】

本発明においては、被験試料に含まれる蛋白質の遊離SH基をSH基保護剤によって化学修飾するために、被験試料にまずSH基保護剤を加えて蛋白質と反応させる。SH基保護剤を加える際の反応条件は、非還元条件であれば特に限定されないが、用いるSH基保護剤についてSH基との反応に好適な条件があれば、その条件に適合させることが好ましい。

【0029】

(3) ジスルフィド結合の切断

次いで、蛋白質が有するジスルフィド結合を切断して、該ジスルフィド結合を形成していたSH基を露出させる。このジスルフィド結合の切断は、還元剤を用いてジスルフィド結合を還元することによって行うことが好ましい。還元剤を用いてジスルフィド結合を切断する場合は、上記2-(2)の記載に従って被験試料中の蛋白質の遊離SH基を保護した後に、該蛋白質と還元剤とを反応させる。実際の操作においては、還元剤は、蛋白質の遊離SH基が保護された後に被験試料に加えればよい。但し、蛋白質の遊離SH基が保護された後に還元剤がその蛋白質と反応する限りにおいては、蛋白質の遊離SH基が保護されるより前又はその保護と同時に、被験試料に還元剤を加えてもよい。そのような場合の1つの例としては、還元剤が可溶性カプセル等に包含されており、その還元剤をSH基保護剤とともに被験試料に添加すると、SH基保護剤が遊離SH基を化学修飾した後に、還元剤が反応液中に放出されてジスルフィド結合を切断する場合が挙げられる。さらに、本発明において用いる還元剤は、SH基保護剤との共存下で、ジスルフィド結合に対する還元作用が妨げられないものであることが好ましい。しかしながら、SH基保護剤との共存により還元作用が妨げられる還元剤を用いる場合には、還元剤を添加する前に脱塩等により被験試料中からSH基保護剤を除去すればよい。

【0030】

本発明においてジスルフィド結合の切断に用いる「還元剤」としては、蛋白質

が有するジスルフィド結合を切断して、SH基を露出させることができる任意の物質を用いることができる。具体的な還元剤の例としては、限定するものではないが、例えばジチオトレイトール (DTT)、ジチオエリスリトール (DTE)、グルタチオン、チオレドキシン、グルタチオンレダクターゼ、メルカプトエタノール、トリブチルフォスフィン、 NaBH_4 、NADPH、チオグリコール酸、NO (一酸化窒素) 等が挙げられる。

【0031】

(4) 露出したSH基の検出

続いて、ジスルフィド結合の切断により露出したSH基を検出する。この露出したSH基の検出は、SH基の検出や定量に用いることができる公知の方法を用いて行えばよい。

【0032】

露出したSH基を検出する方法としては、例えば、露出したSH基を選択的に修飾して、その修飾を検出及び／又は定量する方法が挙げられる。本明細書では、そのような方法に用いられる「SH基を選択的に修飾する物質であって、かつその修飾が検出可能なものである物質」を、「SH基検出物質」と称する。このSH基検出物質としては、SH基の検出・定量用に慣用されるSH試薬の他、SH基と結合する物質、SH基を標識する物質等が挙げられる。

【0033】

SH基検出物質としてSH試薬を用いるSH基の検出法としては、例えば、メルカプチド形成剤をSH基検出物質として用いて、露出したSH基をメルカプチド化することを利用する電流滴定法、p-メルクリ安息香酸 (PMB)、N-エチルマレイミド (NEM)、5,5'-ジチオビス(2-ニトロ安息香酸)等をSH基検出物質として用いて、露出したSH基と反応させ、得られる生成物の吸光度を測定することによるSH基の定量法等が挙げられる。

【0034】

また、SH基検出物質としてSH基と結合する物質 (例としては、SH基と結合する固相) を用いるSH基の検出法としては、例えば、露出したSH基をSH基と結合する固相 (例えばビーズ、フィルター、膜、カラム等) に選択的に結合

させて、その結合を利用して該SH基を有する蛋白質のみを被験試料中から分離し、さらにその蛋白質を常法により検出する方法が挙げられる。SH基と結合する固相としては、具体的には例えば、グルタチオンカラム（ファルマシア社製グルタチオンセファロースカラム）、マレイミド基を導入した磁性ビーズ等が挙げられる。これらの方法では、SH基と結合する物質とSH基との結合によって増加したSH基を有する蛋白質の質量を測定することにより、ジスルフィド結合を定量したり結合部位を決定したりすることが可能である。

【0035】

また、SH基検出物質としてSH基を標識する物質を用いるSH基の検出法としては、例えば、SH基を標識する物質を露出したSH基と反応させて、その結果標識されたSH基が発する標識シグナルを常法により検出する方法が挙げられる。ここで「標識」とは、限定するものではないが、蛍光標識、放射性同位体標識、抗体標識、酵素標識等が挙げられる。

【0036】

SH基検出物質としてSH基を標識する物質を用いる場合、標識シグナルの検出方法は、標識の種類に依存して決定される。標識が蛍光標識である場合には、その標識シグナルは、例えば標識された蛋白質に紫外線を照射することによって放射される蛍光を、蛍光検出装置によって検出すればよい。その蛍光シグナルは、分光光度計を用いてその蛍光波長に対する吸光度で蛍光量を測定することによって検出することができる。蛍光は一般に定量性が高いので、定量した蛍光の測定値からジスルフィド結合の量や結合部位を決定することが可能である。また標識が放射性同位体標識である場合には、液体シンチレーションカウンター等によって放射活性を測定することにより、該標識シグナルの検出を行うことができる。あるいは、該標識シグナルの検出のために、オートラジオグラフィーにより可視化して、放射活性の検出を行ってもよい。標識が抗体標識である場合には、例えば、標識に用いた抗体にたいして特異的な抗原を該抗体と反応させることにより、標識の検出を行うことができる。さらに標識が酵素標識である場合には、該酵素の基質を加えて該酵素と反応させ、その酵素反応の結果得られる発色反応又は蛍光反応等を検出することにより、該標識の検出を行うことができる。これら

の非蛍光性の標識を用いる場合にも、検出の際に標識シグナル量の定量を行って、その測定値からジスルフィド結合量や結合部位を推定することが可能である。

【0037】

本発明の方法においては、SH基検出物質として、SH基に対する蛍光標識試薬を好適に用いることができる。SH基標識物質の具体例としては、限定するものではないが、モノプロモビマン、ベンゾフラザン(ベンゾオキサジアゾール)誘導体(例えば4-フルオロ-7-スルファモイルベンゾフラザン(ABD-F))、ダンシルアジリジン等のアジリジン、フルオレセインマーキュリ酢酸(FMA)、S-メルクリ-N-ダンシルステイン(MDC)、N-(ヨードアセチルアミノエチル)-5-ナフチルアミン-1-スルホン酸(1,5-IEANS)及びその1,8-異性体、4-クロロ-7-ニトロベンゾフラザン(4-クロロ-7-ニトロベンゾ-2-オキサ-1,3-ジアゾール)(NBD-C1)、蛍光性基(例えば2-フェニルベンゾイミダゾール、フルオレセイン、各種ローダミン、シアニン色素等)を導入したN-置換マレイミド(例えばN-(7-ジメチルアミノ-4-メチルクマリニル)マレイミド(DACM)、N-[4-(6-ジメチルアミノ-2-ベンゾフラニル)フェニル]マレイミド、シアニン色素-マレイミド)等が挙げられる。

【0038】

また、露出したSH基を検出する別の方法としては、例えば、ジスルフィド結合を切断するために還元剤としてジチオトレイトールを使用する場合に、ジチオトレイトールとジスルフィド結合との反応により生成される分子内S-S結合を有する環状構造物に対し、280nm付近に現れる吸収を測定することによりSH基を検出・定量することができる。このようにジスルフィド結合の還元反応に伴って得られる生成物を検出又は定量することによっても、露出したSH基を検出することができる。このような場合、ジスルフィド結合を切断するための還元剤は、還元剤としてだけでなくSH基検出物質としても作用する。

【0039】

本発明の方法において用いるSH基検出物質は、上記2-(2)に記載したSH基保護剤としても、用いることが可能なものであってよい。但し、本発明の方法を用いる場合、SH基検出物質としては、その検出系でSH基保護剤として用いる

物質とは異なる物質を用いる。さらに、SH基検出物質による修飾を特異的に検出するためには、SH基検出物質による修飾は、その検出系で用いるSH基保護剤による化学修飾とは区別されて検出されるものを用いる。例えば、SH基保護剤として非蛍光試薬、SH基検出物質として蛍光性試薬を使用し、蛍光検出を用いれば、SH基検出物質による修飾を、SH基保護剤による保護修飾とは区別して検出することができる。

【0040】

本発明の方法において、特に好適に用いることができるSH基検出物質とSH基保護剤の組み合わせは、SH基検出物質としてモノブロモビマン、SH基保護剤としてヨードアセトアミドを用いるものである。

【0041】

本発明において、露出したSH基をSH基検出物質を用いて検出する場合には、ジスルフィド結合を切断してSH基を露出させた後に、SH基検出物質と露出したSH基とを反応させる。実際の操作においては、SH基検出物質は、蛋白質の遊離SH基が保護された後に、還元剤の添加と同時又は還元剤の添加より前若しくは後に被験試料に加えればよい。本明細書において、SH基検出物質を被験試料に「加える」とは、被験試料中にSH基検出物質を混合することだけでなく、被験試料とSH基検出物質とを他の様々な状態で接触させること、例えばSH基検出物質がSH基と結合する固相である場合には、被験試料中にSH基検出物質を配置すること、又はSH基検出物質に被験試料を添加することなども包含する。なおSH基検出物質は、被験試料中の蛋白質の遊離SH基が保護された後にその蛋白質と反応する限りにおいては、蛋白質の遊離SH基が保護されるより前又はその保護と同時に、被験試料に加えてもよい。そのような場合の1つの例としては、SH基検出物質が可溶性カプセル等に包含されており、そのようなSH基検出物質を被験試料にSH基保護剤とともに添加すると、SH基保護剤が遊離SH基を化学修飾した後にSH基検出物質が反応液中に放出される場合が挙げられる。このような場合、SH基検出物質は、還元剤と同じカプセル中に含有させて用いることもできるし、別々のカプセルに含有させて用いることもできるし、SH基検出物質だけをカプセルに含有させて用いてもよい。さらに、本発明に用

いるSH基検出物質は、SH基保護剤及び／又は還元剤との共存下で、露出したSH基に対する選択的な修飾が妨げられないものであることが好ましい。しかしながら、SH基保護剤及び／又は還元剤との共存によりそのような選択的な修飾が妨げられるSH基検出物質を用いる場合には、SH基検出物質を添加する前に、脱塩又は蛋白質の分離等によりSH基保護剤及び／又は還元剤を除去しておけばよい。なお、本発明のSH基検出物質は、必要であれば発色基質等の補助物質とともに添加してもよい。

【0042】

また、SH基検出物質を用いて露出したSH基の検出を行う場合には、露出したSH基とSH基検出物質とを反応させた後、複数種類の蛋白質が含有されている被験試料についてそのまま検出を行うことができる。しかしながら、ジスルフィド結合を有する蛋白質を検出した後に単離する場合には、露出したSH基とSH基検出物質とを反応させた後の被験試料を、従来公知の蛋白質分離法によって予め分離してから、各検出に用いてもよい。例えば、前記被験試料について、当業者に公知の一次元電気泳動、二次元電気泳動、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）、カラムクロマトグラフィー、質量分析等の方法で、蛋白質を分離してから検出に用いてもよい。この場合に蛋白質を分離して検出に供する試料は、被験試料を電気泳動で分離する場合には電気泳動ゲルであり、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）により分離する場合には、溶出させた分子量画分である。本発明の方法では特に、二次元電気泳動により蛋白質を分離してから検出を行うことが好ましい。二次元電気泳動を用いることによって、蛋白質が高い解像度で精度良く単離されるだけでなく、その後の検出を1つの被験試料について一回で行うことができるという利点がある。

【0043】

また、露出したSH基をSH基検出物質を用いて検出する際に、遊離のSH基検出物質も一緒に検出されてしまうおそれがある場合には、露出した検出の前に、被験試料中の蛋白質を遊離のSH基検出物質から分離する。このような場合としては、SH基検出物質として、SH基を標識する物質であってそれ自体標識シグナルを発するもの（例えばフルオレセインを蛍光基として導入したマレイミド

試薬)を用いる場合が挙げられる。一方、それ自体は無蛍光性であるがSH基と反応して生成した誘導体が蛍光性となるような物質(例えば2-フェニルベンゾイミダゾールを蛍光性基として導入したN-置換マレイミド)を用いる場合には、蛋白質を遊離のSH基検出物質から分離しなくても、SH基の標識化を選択的に検出できる。

【0044】

以上のようにして露出したSH基を検出することにより、その露出したSH基を有する蛋白質を、ジスルフィド結合を有する蛋白質として同定できる。すなわち、本発明の検出法によって被験試料において露出したSH基が検出されるならば、その被験試料はジスルフィド結合を有する蛋白質を含む。また電気泳動等により分離した各蛋白質において露出したSH基が検出されるならば、その蛋白質はジスルフィド結合を有する蛋白質である。

【0045】

3. ジスルフィド結合を有する蛋白質の単離及び該蛋白質の同定

続いて、露出したSH基が検出された被験試料から、ジスルフィド結合を有する蛋白質を単離することができる。該蛋白質の単離は、当業者に公知の方法によって行えばよい。露出したSH基の検出を、例えば被験試料中の蛋白質を電気泳動によって分離したゲルについて行った場合には、露出したSH基が検出されたゲルの当該スポット部分を採取して、該ゲルから蛋白質を抽出すればよい。露出したSH基の検出を、例えば被験試料中の蛋白質をHPLCによって分離した分子量画分について行った場合には、必要であればさらにクロマトグラフィー等の精製手法によって該画分に含まれる蛋白質をさらに精製してもよいし、該画分に含まれる蛋白質が十分に精製されていればそのまま単離蛋白質を含む溶液として用いてもよい。あるいは、前記被験試料又は前記画分について、使用した標識に対する抗体を用いてアフィニティーカラム精製を行うことにより、目的の蛋白質を単離してもよい。また、SH基検出物質として、例えばSH基に結合する固相を用いた場合には、露出したSH基をSH基と結合する固相(例えばビーズ、フィルター、膜、カラム等)に選択的に結合させて、その結合を利用して被験試料中から該SH基を有する蛋白質を分離し、さらに該SH基を有する蛋白質を固相

から解離させることにより、ジスルフィド結合を有する蛋白質を取得することができる。このようにして取得した蛋白質を、必要であればさらにクロマトグラフィー等の精製手法によってさらにそれぞれの蛋白質の画分に分離精製することによって単離することもできる。以上の単離工程により、ジスルフィド結合を有する蛋白質を単離し、さらにその分子量、被験試料中の含有量等も明らかにすることができる。

【0046】

本発明の方法では、以上のようにして単離した蛋白質をさらに特性解析することによって同定することもできる。本発明において「蛋白質を同定する」とは、蛋白質を、既知蛋白質又は既知蛋白質と同じクラスに属する蛋白質群に分類することを意味する。

【0047】

本発明において、単離した蛋白質を同定するためには、該蛋白質について特性解析を行い、その結果示された特性を既知蛋白質の特性と比較して、既知蛋白質と共通した特性を見つければよい。本発明において「共通した特性」とは、一致するか、または共通点の多い特性を意味する。例えば、その特性がアミノ酸配列であれば、「共通した特性」とは、同一のアミノ酸配列を有するか、又は相同性の高いアミノ酸配列を有することを意味する。また、本発明における「特性解析」とは、単離した蛋白質について、電気泳動結果からの該蛋白質の分子量及び／又は等電点等の決定、一部又は全部のアミノ酸配列の決定、該蛋白質をコードする遺伝子又はcDNA配列の探索及び決定、該蛋白質についての質量分析等を行うことを意味する。アミノ酸配列の決定には、蛋白質をペプチダーゼ等により部分分解して、各断片についてエドマン分解法により内部アミノ酸配列を決定することが好ましい。一方、これらの蛋白質の特性を集めたデータベースが複数存在している（GenBank、PIR、PRF、EMBL、SwissProt、PDBSTR等）。そこで、本発明において単離した蛋白質についての特性を、それらのデータベースにおいて検索すれば、共通した特性を有する既知蛋白質をデータベースから抽出することができる。特性が一致する既知蛋白質がデータベースから抽出された場合は、単離された蛋白質はその既知蛋白質として同定される。特性が類似している既知蛋白質がデ

データベースから抽出された場合には、その単離された蛋白質はその既知蛋白質と同じクラスの蛋白質に分類されることになる。

以上のようにして、本発明において単離されたジスルフィド結合を有する蛋白質を同定することができる。

【0048】

4. ジスルフィド結合を有する蛋白質の検出法を利用した他の実施形態

本発明においては、被験試料として特定の精製蛋白質を用いる場合に、上記のジスルフィド結合を有する蛋白質の検出法を利用することによって該蛋白質におけるジスルフィド結合の形成の有無や形成部位を明らかにすることもできる。

【0049】

近年では、遺伝子組換え法を用いた蛋白質の製造が盛んに行われるようになってきている。組換え法による蛋白質製造では、宿主細胞として大腸菌を用いる方法が一般的であるが、大腸菌中では製造された蛋白質において正しいジスルフィド結合が形成されないことが知られているため、場合により昆虫細胞等の他の培養細胞を用いた組換え蛋白質の製造が行われている。蛋白質のジスルフィド結合は、蛋白質の立体構造形成に大きく関与しており、蛋白質の活性の維持に大きな影響を及ぼすことから、組換え法による蛋白質製造において、製造する組換え蛋白質に対応する天然蛋白質がジスルフィド結合を有するか否かを確認し、かつその天然蛋白質のジスルフィド結合の形成部位を同定することは、所望の活性を有する組換え蛋白質を製造する上で重要である。従って、本発明のジスルフィド結合を有する蛋白質の検出法を用いる天然蛋白質のもつジスルフィド結合の分析は、組換え蛋白質を製造する上で有用に用いることができる。

【0050】

5. アレルゲン蛋白質の検出方法

本発明においては、さらに、上記のジスルフィド結合を有する蛋白質の検出法を利用して、被験試料に含まれるアレルゲン蛋白質を検出することができる。すなわち、上記のジスルフィド結合を有する蛋白質の検出方法によって検出されるジスルフィド結合を有する蛋白質は、アレルゲン蛋白質である。本発明のアレルゲン蛋白質の検出方法は、従来のIgE抗体を用いたイムノブロッティング法に

よる検出法と比較して、非常に高感度である。

【0051】

まとめると、本発明のアレルゲン蛋白質の検出方法は、以下の①～③の手順によって行うものであり、この検出方法の詳細については上記のジスルフィド結合を有する蛋白質の検出方法と全く同一である。

- ①蛋白質の有する遊離SH基を化学修飾することにより保護し、
- ②遊離SH基が保護された蛋白質のもつジスルフィド結合を切断して、該ジスルフィド結合を形成していたSH基を露出させ、
- ③露出したSH基を検出することによって、露出したSH基を有する蛋白質を、アレルゲン蛋白質として同定する。

【0052】

本発明のアレルゲン蛋白質の検出方法を適用してアレルゲン蛋白質の検出を行うのに適した被験試料も、上記のジスルフィド結合を有する蛋白質の検出方法と全く同じであるが、アレルゲン蛋白質を含有することが予想される蛋白質試料を用いることがより好ましい。さらに、被験試料としては、イネ科植物の種子、ハウスダスト、花粉からの蛋白質抽出物を用いることが特に好ましい。

【0053】

なお、本発明のアレルゲン蛋白質の検出方法によってアレルゲン蛋白質を検出できることは、ジスルフィド結合と蛋白質のアレルゲン性とが関連するという報告（例えば、Huby, R. D., et al., Toxicological Sciences 55, 235-246）とも一致している。

【0054】

本発明のアレルゲン蛋白質の検出方法において、特に好適である具体的な手順は、以下の通りである：

- (1) 被験試料に非蛍光試薬ヨードアセトアミドを添加し、
- (2) さらに還元剤としてジチオトレイトールを添加し、
- (3) さらに蛍光性試薬モノブロモビマンを添加した後、得られた反応溶液を二次元電気泳動で分離し、
- (4) 電気泳動ゲルに紫外線を照射して、得られた蛍光スポットをアレルゲン蛋

白質として検出する。

【0055】

この方法は、従来法と比較して、特に次のような利点を有する。

- ・蛍光標識を用いることによって微量なアレルゲン蛋白質を検出できる。
- ・二次元電気泳動で分離することにより、蛋白質の解析解像度が高くなる。
- ・膜への転写を必要とせず、微量な蛋白質を消失する危険度が低い。

【0056】

本発明においては、上記のアレルゲン蛋白質の検出方法を利用して、被験試料について、アレルゲン性を有するか否かを判定することもできる。この場合、被験試料中にアレルゲン蛋白質が検出されれば、被験試料はアレルゲン性を有する。

【0057】

また別の実施形態では、上記のアレルゲン蛋白質の検出方法を利用して、被験試料中に含まれるアレルゲン蛋白質のスクリーニングを行うことができる。この場合、被験試料において検出されたアレルゲン蛋白質を単離することにより、被験試料中のアレルゲン蛋白質をスクリーニングすることができる。この蛋白質の単離は、上述のジスルフィド結合を有する蛋白質の単離と同様に、通常公知の方法に従って行うことができる。

【0058】

上記のように単離したアレルゲン蛋白質についても、ジスルフィド結合を有する蛋白質と同様に、特性解析によって同定することができる。すなわち、単離したアレルゲン蛋白質を同定するために、該アレルゲン蛋白質について特性解析を行い、その結果示された特性を既知アレルゲン蛋白質の特性と比較して、既知アレルゲン蛋白質と共通した特性を見つければよい。「共通した特性」「特性解析」については、上記のジスルフィド結合を有する蛋白質についての記載と同様である。

【0059】

アレルゲン蛋白質の特性の情報も、データベース等から入手することができる (GenBank、PIR、PRF、EMBL、SwissProt、PDBSTR、Farrp allergen database(

<http://www.allergenonline.com/>)等)。本発明において単離したアレルゲン蛋白質についての特性を、例えばそれらのデータベースにおいて検索すれば、共通した特性を有する既知アレルゲン蛋白質をデータベースから抽出することができる。特性が一致する既知アレルゲン蛋白質がデータベースから抽出された場合は、単離されたアレルゲン蛋白質はその既知アレルゲン蛋白質として同定される。特性が類似している既知アレルゲン蛋白質がデータベースから抽出された場合には、その単離された蛋白質はその既知アレルゲン蛋白質と同じクラスのアレルゲン蛋白質に分類されることになる。

【0060】

アレルゲン蛋白質の同定においては、当技術分野において、次のような方法が慣用されている。すなわち、エドマン分解法により目的の蛋白質の内部アミノ酸配列（部分配列）を決定し、その部分配列をクエリー配列としてアミノ酸配列データベースにおいて検索して、その蛋白質の部分配列と完全に一致するアレルゲン蛋白質の部分配列がデータベースから抽出されれば、その蛋白質をデータベースから抽出されたアレルゲン蛋白質として同定する。同様にして、その蛋白質の部分配列と高い相同性を有するアレルゲン蛋白質の部分配列がデータベースから抽出されれば、その蛋白質を、データベースから抽出された該アレルゲン蛋白質と同じクラスに属するアレルゲン蛋白質として同定する。本発明においても、単離されたアレルゲンの同定に、この方法を利用することが好ましい。

本発明において単離されたアレルゲン蛋白質は、以上説明した方法に従って、同定することができる。

【0061】

6. 検出方法以外の実施形態

以上記載の被験試料中の蛋白質に対する分析方法は、いずれも「ジスルフィド結合を有する蛋白質の検出」を利用する方法である。従って、ジスルフィド結合を有する蛋白質を検出するために用いるSH基保護剤及びSH基検出物質を含むキットは、本発明のジスルフィド結合を有する蛋白質の検出法、アレルゲン蛋白質の検出方法、及びそれらを利用する蛋白質の分析方法を実施する上で、好適に使用することができる。このように、SH基保護剤及びSH基検出物質を含む、

ジスルフィド結合を有する蛋白質又はアレルゲン蛋白質を検出するためのキットも、本発明の範囲に包含される。好適には、これらのキットは、ヨードアセトアミド及びモノプロモビマンを含む、ジスルフィド結合を有する蛋白質又はアレルゲン蛋白質を検出するためのキットである。これらのキットは、さらに還元剤（好ましくはジチオトレイトール）を含むものでもよい。

【0062】

【実施例】

本発明を、実施例を用いて以下に具体的に説明する。しかしながら、これらの実施例は本発明の範囲を限定するものではない。

【0063】

[実施例 1]

コメ種子 20 g を乳ばちを用いて粉碎した。この粉末を 1 M 塩化ナトリウム溶液 400 ml 中に入れ、1 時間にわたり攪拌することによって、該種子に含まれる蛋白質を緩衝液中に溶出させた。この溶液を 14,000 G、5 分間の遠心分離に供して不溶成分を沈澱させた後、上清を採取した。この上清を、透析により脱塩し、次いで凍結乾燥した。この凍結乾燥物の 1/80 量（コメ種子 0.25 g に相当する）を、8 M 尿素、0.5 % CHAPS、0.1 % Bio-Lytes を含む等電点電気泳動用緩衝液に溶解した。この溶液に SH 基保護剤としてヨードアセトアミドを添加（最終濃度 5 mM）し、室温で 1 時間保温した。さらに還元剤としてジチオトレイトールを添加（最終濃度 5 mM）し、室温で 1 時間保温した。さらに SH 基標識物質としてモノプロモビマンを添加（最終濃度 10 mM）し、室温で 15 分間保温した。

このようにして得た反応溶液を、二次元電気泳動にかけ、反応液中の蛋白質を分離した。

【0064】

一次元電気泳動はバイオラッド社製のプロティアン IEF セルシステムを用い、製造者のマニュアルに従って実施した。上限 8000 V、電圧時間積算 3,5000 VH の条件で 6 時間泳動した。泳動後、ゲルを 62.5 mM のトリス塩酸バッファ、5%メルカプトエタノール、2%SDS、5%スクロースを含む緩衝液に 10 分間

浸し、二次元目の電気泳動に供した。

【0065】

二次元電気泳動はLaemmliの手法(Laemmli, U. K., Nature, 227, 680-685 (1970))に従って行った。375mMのトリス／グリシンバッファーを含み、10～20%の濃度勾配をもつアクリルアミドゲルを用いた。泳動バッファーには0.1% SDSを含む25mMトリス／グリシンバッファーを用いた。250V、3時間にわたる泳動を行った。

【0066】

このようにして得た泳動ゲルについて、蛍光検出装置(FAS 2525、TOYOBO)により、蛍光シグナルを検出した。蛍光が検出されたゲル上のスポットが、モノプロモビマンで蛍光標識された蛋白質である(図2B)。図2Bでは、例えば1～6で示している蛍光スポットが見出された。

【0067】

また、この実施例では対照実験として、クーマシーブルー染色により全蛋白質の検出を行った(図2A)。図2Aでは、例えば1～8で示している染色スポットが見出された。

【0068】

図2Aと図2Bとを比較したところ、図2Aで示された1～6の染色スポットに対して、図2Bにおける1～6の蛍光スポットが、それぞれ対応する位置に存在していた。すなわち、1～6のスポットは蛋白質であり、かつジスルフィド結合を有する蛋白質である。この結果から、1～6で示されたスポットに存在する蛋白質は、アレルゲン蛋白質であることが示された。

【0069】

一方、図2Aにおける7及び8の染色スポットは、図2Bの対応する位置に蛍光スポットが示されなかった。このことから、図2Aにおける7及び8のスポットは、蛋白質ではあるが、アレルゲン蛋白質ではないことが示された。

【0070】

[実施例2]

図2Bにおいて蛍光シグナルが検出されたスポット(1～6)をゲルから切り

出し、トリプシンでゲル内消化を行って、スポットに含まれる蛋白質を断片化した。断片化した蛋白質をHPLCにかけて分離した後、エドマン法により内部アミノ酸配列を決定した。各スポットを構成する蛋白質について、決定した内部アミノ酸配列を表1に示す。表1のアミノ酸配列において、「C^mBBr」は、モノブロモビマンで標識されたSH基を有するシステイン残基を表す。

【0071】

【表1】

スポット No.	内部アミノ酸配列	配列番号	データベースから 抽出された相同蛋白質	配列が一致する アミノ酸の個数 (%)
1	C ^{mBB} DALSVLVR	配列番号 1	トリプシン/アミラーゼ インヒビター	7/9 (77.8%)
	QLLEPC ^{mBB} C ^{mBB} R	配列番号 2	n. d.	
	C ^{mBB} NLQHTGFFGC ^{mBB} PMFGGGM	配列番号 3	n. d.	
2	LSEALGVSSQVA	配列番号 4	グルテリン酸性鎖	12/12 (100%)
3	LQAFEPIR	配列番号 5	グルテリン酸性鎖	8/8 (100%)
	DFLLAGNK	配列番号 6	グルテリン酸性鎖	8/8 (100%)
4	SQAGTTEFFDVS	配列番号 7	グルテリン酸性鎖	12/12 (100%)
5	VEPQQC ^{mBB} SIFAAG	配列番号 8	α -グロブリン	12/12 (100%)
6	VIQPQGLLVPR	配列番号 9	グルテリン酸性鎖	11/11 (100%)

【0072】

次に、それらの内部アミノ酸配列をそれぞれクエリー配列として用いて、アミノ酸配列データベース (GenBank、PIR) において、FASTA プログラム及び BLAST プログラムを用いた相同性検索を行った。その検索結果からは、上記の各内部アミノ酸配列が、既知アレルゲン蛋白質が有する一部のアミノ酸配列と、同一又は高い相同性を有することが示された。

【0073】

表1に示されるように、スポット2～6の蛋白質の内部アミノ酸配列は、相同性の高い蛋白質としてデータベースから抽出された既知アレルゲン蛋白質の一部のアミノ酸配列と100%一致していた。従って上記スポットの蛋白質は、それらの既知アレルゲン蛋白質として同定された。一方、スポット1の蛋白質の内部アミノ酸配列は、相同性の高い蛋白質としてデータベースから抽出された既知アレルゲン蛋白質であるトリプシン/アミラーゼインヒビターの一部のアミノ酸配列 (配列番号1) と、77.8%の相同性を有していた。この結果より、スポット1の蛋白質は、トリプシン/アミラーゼインヒビターと同じクラスに属するアレルゲン蛋白質として同定された。さらに、スポット1の蛋白質は、その内部アミノ酸配列として解析した2つの別のアミノ酸配列 (配列番号2及び3) について、データベースから相同性の高い蛋白質が抽出されなかった (表1中、n.d. として示す) ことから、未知のアレルゲン蛋白質であると推定された。

【0074】

このように、モノプロモビマンにより蛍光標識された蛋白質を、既知アレルゲン蛋白質と同じクラスに属する未知アレルゲン蛋白質 (スポット1) 又は既知アレルゲン蛋白質 (スポット2～6) として同定することができた。

【0075】

以上の実施例から、本発明の方法に従って、コメ種子からアレルゲン蛋白質を高感度に検出、単離及び同定することができることが示された。すなわち本発明の方法は、アレルゲン蛋白質の検出、同定及び未知のアレルゲン蛋白質のスクリーニングに有効であることが明らかとなった。

【0076】

【発明の効果】

本発明は、被験試料中のジスルフィド結合を有する蛋白質を高感度に検出する方法、及び被験試料中のアレルゲン蛋白質を高感度に検出する方法を提供する。本発明の方法に従えば、ジスルフィド結合を有する蛋白質又はアレルゲン蛋白質を特異的に検出することができるだけでなく、微量な蛋白質を減失せずにそれらの蛋白質の高感度な分析を行うことができる。

【0077】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> NATIONAL AGRICULTURAL RESEARCH ORGANIZATION

<120> METHOD FOR DETECTION OF ALLERGENIC PROTEINS

<130> P02-355

<140>

<141>

<160> 9

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> Oryza sativa

<400> 1

Cys Asp Ala Leu Ser Val Leu Val Arg

1

5

<210> 2

<211> 8

<212> PRT

<213> Oryza sativa

<400> 2

Gln Leu Leu Glu Pro Cys Cys Arg

1

5

<210> 3

<211> 18

<212> PRT

<213> Oryza sativa

<400> 3

Cys Asn Leu Gln His Thr Gly Phe Phe Gly Cys Pro Met Phe Gly Gly

1

5

10

15

Gly Met

<210> 4

<211> 12

<212> PRT

<213> Oryza sativa

<400> 4

Leu Ser Glu Ala Leu Gly Val Ser Ser Gln Val Ala

1

5

10

<210> 5

<211> 8

<212> PRT

<213> Oryza sativa

<400> 5

Leu Gln Ala Phe Glu Pro Ile Arg

1

5

<210> 6

<211> 8

<212> PRT

<213> Oryza sativa

<400> 6

Asp Phe Leu Leu Ala Gly Asn Lys

1

5

<210> 7

<211> 12

<212> PRT

<213> Oryza sativa

<400> 7

Ser Gln Ala Gly Thr Thr Glu Phe Phe Asp Val Ser

1

5

10

<210> 8

<211> 12

<212> PRT

<213> Oryza sativa

<400> 8

Val Glu Pro Gln Gln Cys Ser Ile Phe Ala Ala Gly

1

5

10

<210> 9

<211> 11

<212> PRT

<213> Oryza sativa

<400> 9

Val Ile Gln Pro Gln Gly Leu Leu Val Pro Arg

1

5

10

【図面の簡単な説明】

【図 1】

図 1 は、本発明の方法におけるジスルフィド結合を有する蛋白質の検出法の典型的な例を図示している。○は S H 基保護剤、●は S H 基検出物質による、S H 基の修飾を示す。

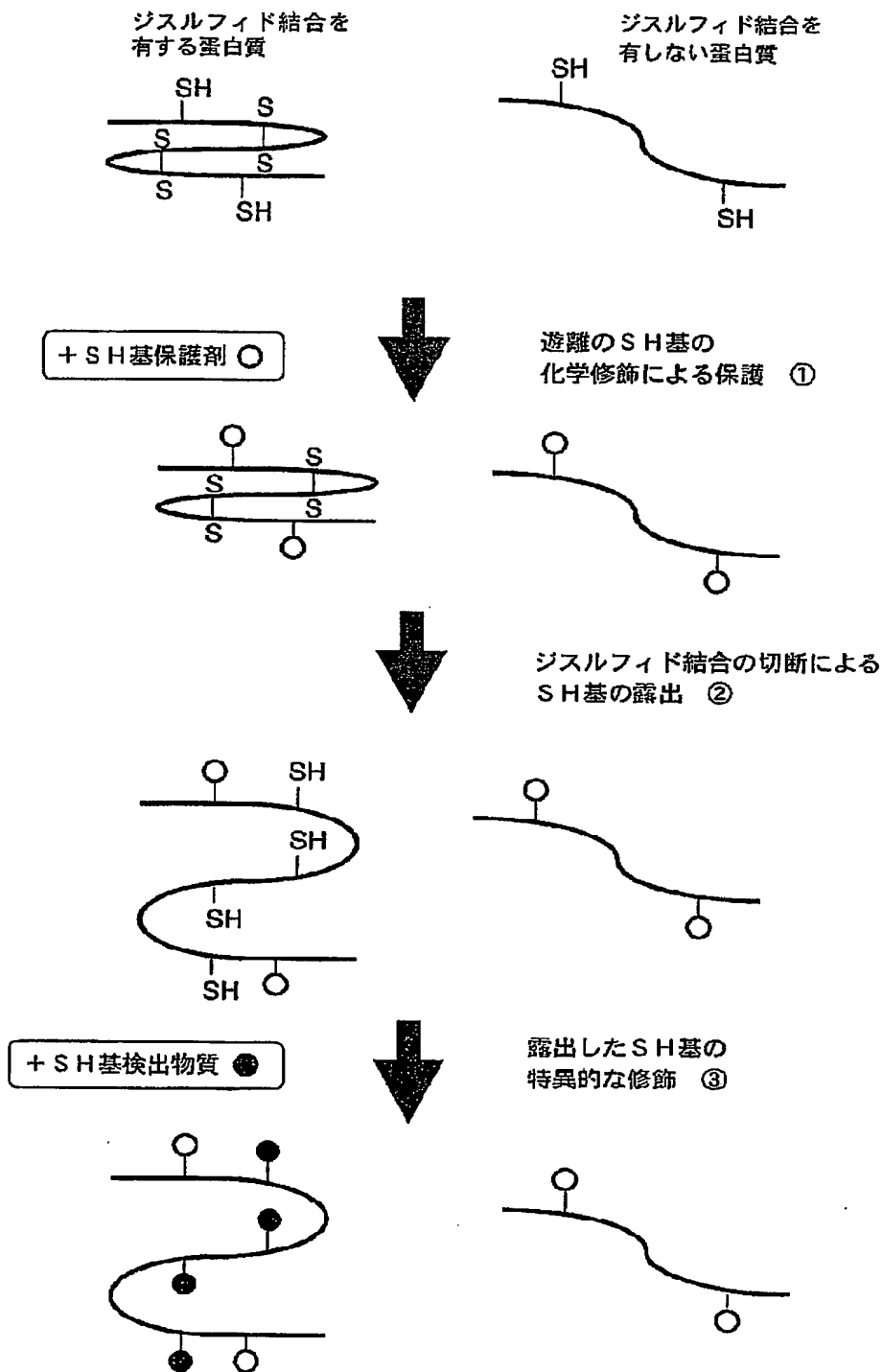
【図 2】

図 2 は、コメ種子からの抽出物を被験試料として本発明の方法を行った、二次元電気泳動の結果を示す写真である。A は、含まれる全ての蛋白質をクーマシーブルー染色で可視化した結果を示す。B は、本発明の方法に従って露出した S H 基をモノブロモビマンにより蛍光標識した蛋白質の蛍光検出の結果を示す。1 ～ 8 の数字は、内部アミノ酸配列を決定して分析を行った蛋白質のスポットを示す。

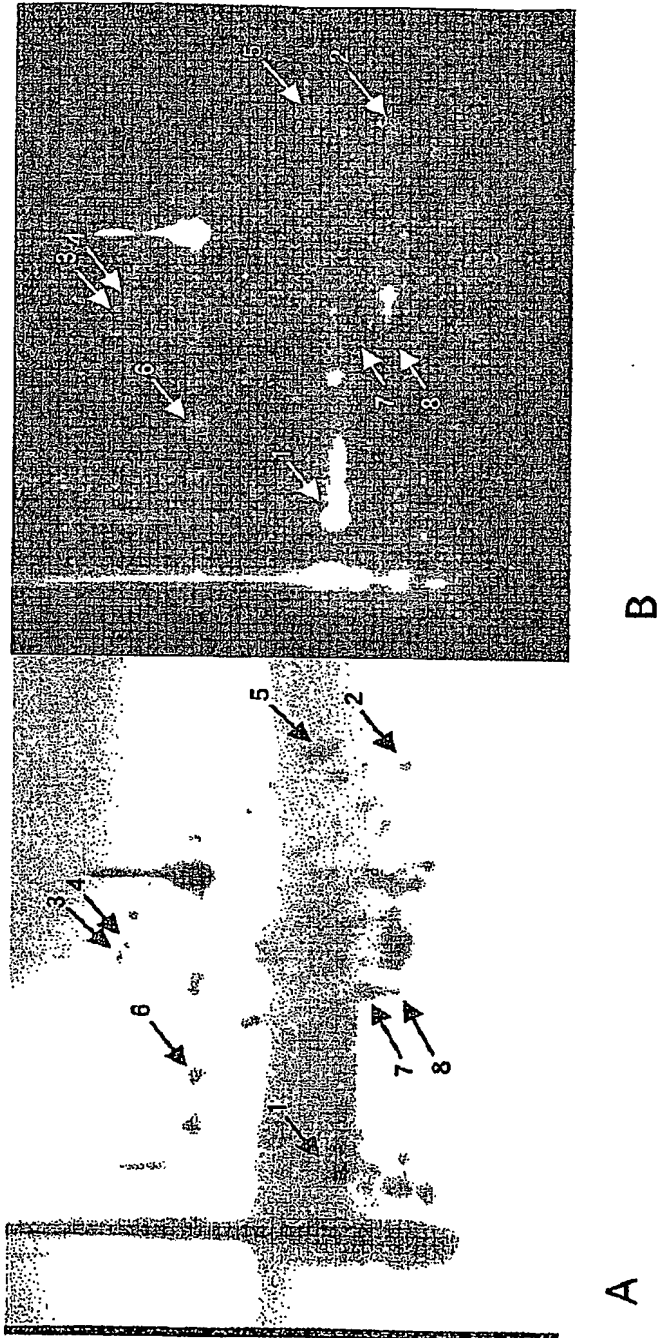
。

【書類名】 図面

【図 1】



【図 2】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 アレルゲンの検出方法の提供。

【解決手段】 被験試料中の蛋白質の遊離SH基を化学修飾することにより保護し、遊離SH基が保護された蛋白質のジスルフィド結合を切断してSH基を露出させ、露出したSH基を検出することを含む、ジスルフィド結合を有する蛋白質又はアレルゲン蛋白質の検出方法。

【選択図】 なし

特願 2 0 0 2 - 2 3 6 0 4 8

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[5 0 1 2 0 3 3 4 4]

1. 変更年月日

2 0 0 1 年 5 月 2 2 日

[変更理由]

新規登録

住 所

茨城県つくば市観音台 3 - 1 - 1

氏 名

独立行政法人 農業技術研究機構